

# 葡萄酒苹果酸-乳酸发酵接种时间选择的研究\*

王 华 张春晖 李 华

(西北农业大学葡萄酒学院 杨凌 712100)

**摘要:** 分别在佳利酿葡萄酒酒精发酵前期(第 I 阶段)、中后期(第 II 阶段)和结束时(第 III 阶段)接种酒明串珠菌(*Leuconostoc oenos*) 31DH, 进行苹果酸-乳酸发酵(MLF)接种时间选择的研究, 结果表明: 不同阶段接种经 MLF 后总酸降幅均为 2.6g/L; 挥发酸含量上升且第 I 阶段 > 第 II 阶段 > 第 III 阶段; 挥发酯以第 II 阶段含量最高, 为 0.37g/L, 同其他两阶段含量相比较, 差异显著( $\alpha = 0.05$ ); 接种时间影响着接种后菌群成活率和迟滞期的长短; 接种酒明串珠菌 31DH 进行 MLF 应以第 III 阶段为宜。根据 MLF 对酒质的影响, 本研究认为, 可以把 MLF 后酒中挥发酸的含量作为选择接种时间的重要依据。

**关键词:** 酒明串珠菌 31DH, 苹果酸-乳酸发酵, 接种时间, 葡萄酒

**中图分类号:** TS262.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-012-04

## CHOICE OF INOCULATION STAGE FOR MALOLACTIC FERMENTATION IN WINE

WANG Hua ZHANG Chun-Hui LI Hua

(College of Enology, Northwestern agricultural University, Yangling 712100)

**Abstract:** *Leuconostoc oenos* 31DH was inoculated in winegrape Carignane must undergone alcohol fermentation (AF) at three different stages, which were stage I (begining of AF), stage II (middle AF) and stage III (end of AF). The results indicated that in different three stages, the total acid reduction were all 2.6g/L, but the content of volatile acidity was stage I > II > III > after malolactic fermentation (MLF). In stage II the volatile ester content was highest (0.37g/L) than that of stage I and III. The inoculation stages also affected *Leuc. oenos* 31DH lag phase and survival rate after inoculation, *Leuc. oenos* 31DH should be inoculated in stage III for MLF. In this study, we could regard the increment of volatile acidity in wine after MLF as the main criterion for choosing inoculation stage.

**Key words:** *Leuconostoc oenos* 31DH, Malolactic fermentation, Inoculation stage, Wine

苹果酸-乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF)是葡萄酒酿造过程中主要的降酸方法之一。控制良好的 MLF 不仅降酸效果明显, 而且这一过程对于提高葡萄酒的结构协调性、香味复杂性和对微生物的稳定性等方面也有着重要意义<sup>[1]</sup>。在实际生产中, 自然诱发 MLF 由于受多种因素的制约而只能在特定的条件下采

用, 现在的趋势是人工接种进行 MLF, 以便于控制、监测这一发酵过程, 从而使之能够更好地增进酒质。而在人工接种工艺操作方面, 接种时间的确定争议较多, 尚无定论。主要有 3 种意见<sup>[2]</sup>: (1) 酒精发酵前接种; (2) 酒精发酵期

\* 陕西省科技计划项目(95K02-G8-02)

收稿日期: 1998-11-23, 修回日期: 1999-06-30

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

间接种; (3)酒精发酵结束后接种。目前,我国在 MLF 人工接种方面开展了一些工作,但仍有许多问题有待解决。为此,我们就 MLF 接种时间选择问题进行了一些研究,以期 MLF 的生产操作提供理论依据和合适的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 菌种与酿酒葡萄原料

葡萄酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 1450 由宁夏玉泉葡萄酒厂提供,酒明串珠菌 (*Leuconostoc oenos*) 31DH 活性干细菌由中国食品与发酵工业科学研究所提供。供试酿酒葡萄原料为成熟度良好的佳利酿 (Carignane)。

1.2 菌种活化与扩大培养

31H 活性干细菌活化方法按指导说明进行。扩大培养采用葡萄汁液体培养基,按刘玉田等的方法进行<sup>[3]</sup>。待菌体数达  $10^9$  个/mL 时接种。

1.3 接种时间的设置

分别在酒精发酵过程中的 3 个阶段按 3% 的接种量接入经扩大培养的 31DH 细菌种子

液:第 I 阶段,发酵初期酒精度 1%~2% (φ);第 II 阶段,发酵中后期酒精度为 7%~9% (φ);第 III 阶段,酒精发酵结束时接种。MLF 温度控制在 18℃~21℃ 之间,各处理重复 3 次。

1.4 分析方法

1.4.1 酒精度、总糖、总酸、总 SO<sub>2</sub>、游离 SO<sub>2</sub> 和挥发酸含量的测量:按葡萄酒、果酒通用试验方法 (GB/T15038-94) 进行。

1.4.2 挥发酯:水解后中和滴定法。

1.4.3 pH 值: pH S-2 型酸度计测定。

1.4.4 MLF 监测:纸层析法<sup>[4]</sup>,展开剂为丁醇-乙酸,显色剂为溴酚蓝。

1.4.5 菌体计数:对 31DH 进行氯化亚甲基蓝染色,显微镜下血球计数板计数<sup>[5]</sup>。

2 结果与分析

2.1 接种前发酵汁成分分析

接种前对 3 个接种阶段的发酵汁成分进行了分析 (表 1),表 1 表明,随着酒精发酵的进行,发酵汁中总糖含量下降,酒精度升高,总 SO<sub>2</sub> 和游离 SO<sub>2</sub> 浓度降低,挥发酸和挥发酯含量上升,

表1 3个接种阶段接种前发酵成分分析

接种时间	酒精度 (φ)	总糖 (g/L)	总酸 (g/L)	pH	总SO <sub>2</sub> (mg/L)	游离SO <sub>2</sub> (mg/L)	挥发酸 (g/L)	挥发酯 (g/L)
第I阶段	3.0	126.5	8.83	3.24	42.7	12.6	0.14	0.10
第II阶段	8.2	30.6	8.80	3.38	24.2	7.6	0.18	0.18
第III阶段	10.5	<4.0	8.62	3.38	12.4	3.2	0.24	0.21

注:总酸以酒石酸计,挥发酸以乙酸计,挥发酯以乙酸乙酯计,下同

pH 值和总酸含量变化相对较小。

2.2 接种阶段与 MLF 过程中酒成分的变化

2.2.1 总酸的变化:接种时间的不同,MLF 引起的酸降幅度不存在差异,都为 2.6g/L。MLF 的降酸作用主要是由于苹果酸 (二元酸) 在乳酸菌的作用下,经脱羧作用转化为乳酸 (一元酸),发酵汁中苹果酸含量占总酸含量的比例决定了酸降的幅度<sup>[1]</sup>。

2.2.2 挥发酸含量的变化:葡萄酒中的挥发酸主要是乙酸。作为衡量葡萄酒是否发生酸败的指标,挥发酸的含量在大多数国家有严格的规定<sup>[6]</sup>。图 1 说明,3 个阶段接种 31DH 都不同程度地导致 MLF 结束后挥发酸含量上升,幅度在

0.15~0.36g/L 之间,各处理间比较,第 I 阶段 > 第 II 阶段 > 第 III 阶段。

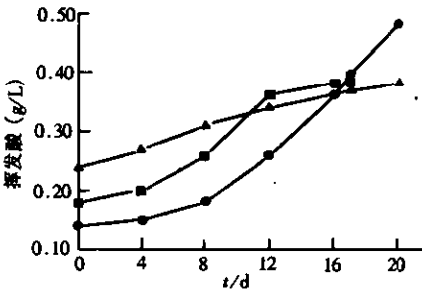


图1 MLF过程中挥发酸变化

—●— 第I阶段, —■— 第II阶段, —▲— 第III阶段

2.2.3 挥发酯含量的变化:挥发酯影响着葡

葡萄酒的香气,适当含量的挥发酯会使酒香加浓,有利于酒的风味复杂性的形成<sup>[7]</sup>。表2表明,不同阶段接种31DH进行MLF后,葡萄酒中挥发酯的含量都有较大幅度的上升。这可能有两个原因:一是酵母菌代谢终产物中挥发酯的积累导致其含量的升高;二是随着发酵汁中酒精度的升高,酒精与酒中的有机酸的酯化反应速度增大而使挥发酯含量升高<sup>[2]</sup>。从表2看出,第II阶段接种31DH进行MLF后,挥发酯含量最高,其含量与第I、第III两阶段挥发酯含量比较,差异显著( $\alpha = 0.05$ )。而MLF前后挥发酯的增加值以第III阶段最低,与前两者相比,差异显著( $\alpha = 0.05$ )。

表2 MLF前后挥发酯的变化

接种时期	挥发酯含量(g/L)		增加值
	MLF前	MLF后	
第I阶段	0.10	0.31 a	0.21 a
第II阶段	0.18	0.37 b	0.19 a
第III阶段	0.21	0.32 a	0.11 b

### 2.3 不同阶段接种 MLF 过程中菌群的消长

3个阶段接种31DH进行MLF的过程中,菌群的成活率和迟滞期的长短各不相同(图2)。其中,第III阶段接种菌群的迟滞期最长,第I阶段次之,第II阶段最短。这可能是造成不同接种阶段MLF完成时间存在差异的根本原因。

影响31DH存活率和迟滞期长短的因素主要有酒精、 $\text{SO}_2$ 浓度和营养条件<sup>[8]</sup>。第I阶段接种,发酵汁酒精发酵刚刚启动,此时营养丰富,酒精浓度较低,但游离 $\text{SO}_2$ 浓度比较高,而且有些酵母的生长对乳酸菌的生长有抑制作用;第II阶段接种,乳酸菌不会受到高浓度酒精的影响,游离 $\text{SO}_2$ 浓度此时也较低,但是酒中的营养物质含量较低,以及在一定环境中酵母代谢的有害成分可能会抑制乳酸菌的生长;第III阶段接种,乳酸菌可以从酵母自溶物中获得营养,但此时酒精含量最高,对乳酸菌有较强的抑制或杀伤作用(表1)。由此可见,在各阶段接种,都有其双重性,每一菌种对各因素的敏感程度不同而影响着接种成活率和迟滞期的长短,从而

导致菌群在MLF过程中消长动态的差异。

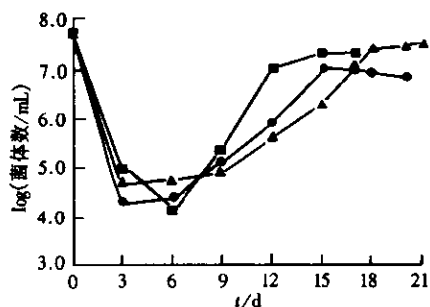


图2 不同阶段接种对菌群消长的影响

—●— 第I阶段, —■— 第II阶段, —▲— 第III阶段

### 2.4 不同阶段接种对 MLF 速度的影响

MLF的速度可以以接种乳酸菌开始到该过程结束所持续的天数来表示<sup>[2]</sup>。通过纸层析对MLF进行监测,以苹果酸斑点的消失和乳酸斑点的扩大作为MLF的结束。结果表明,第I阶段接种,MLF需20d,第II阶段需17d,第III阶段需21d。

## 3 讨论

根据菌株的不同酿酒特性,通过酿造工艺的控制,使MLF能够降低葡萄酒酸度,提高风味复杂性和增加葡萄酒对微生物的稳定性,并且使MLF工艺易于操作是选择MLF接种时间的标准和依据。本研究表明,不同阶段接种进行MLF后都会不同程度地提高酒中挥发酸的含量(图1)。因此,可以把MLF后挥发酸含量作为选择MLF接种时间的一个重要指标。对于产挥发酸较少和耐 $\text{SO}_2$ 与酒精度能力较弱的菌株,可以考虑在第II阶段接种,如果在酒精发酵结束后接种,常会造成接种失败;对于能耐较高酒精度、酿酒特性良好的菌株,主张在第III阶段接种。在绝大多数情况下都不应当建议在第I阶段接种,这必然导致挥发酸含量的大幅度上升。同时,如果酒精发酵迟缓或偶然停止,有可能引起葡萄酒的乳酸酸败<sup>[6]</sup>。这也表明,在任何菌株投入生产使用以前,都要研究其酿酒特性,实验证明<sup>[9]</sup>,31DH能耐较高浓度的酒精和 $\text{SO}_2$ ,因此应选择第III阶段接种为宜。

## 参 考 文 献

- [1] 王华, 张春晖, 李华. 西北农业大学学报, 1996, 4: 92~98.
- [2] 安丹玫. 食品与发酵工业, 1988, 5: 1~13.
- [3] 刘玉田, 徐滋恒, 陈肖兴等著. 现代葡萄酒酿造技术. 济南: 山东科技出版社, 1990.
- [4] 李华. 葡萄酒酿造与质量控制. 陕西: 天则出版社, 1990.
- [5] 范秀蓉, 李武, 沈萍编. 微生物学实验(第二版), 北京: 高等教育出版社, 1989.
- [6] 李华. 现代葡萄酒工艺学. 西安: 陕西人民出版社, 1995.
- [7] Davis C R, Wibowo D J, Lee T H. Appl Environ Microbiol., 1986, 51: 539~545.
- [8] Britz T J, Tracey R P. J Appl Bacteriol., 1990, 68: 21~31.
- [9] 张春晖, 李华, 夏霜梅. 微生物学通报, 1997, 1: 14~18.